

La génétique inverse dans l'étude des réovirus : Progrès, obstacles et développements futurs

Guy Lemay

*Département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal,
Montréal, Québec, Canada H3C 3J7*

guy.lemay@umontreal.ca

Mots-clés : Réovirus, Génétique inverse, Virus oncolytique, Mutagenèse

RÉSUMÉ

En génétique dite « classique », l'examen d'un phénotype conduit à l'étude des gènes impliqués dans son obtention. La génétique inverse est une méthode expérimentale très puissante dans laquelle, au contraire, le matériel génétique est modifié et utilisé pour reconstruire un organisme complet, afin de déterminer le résultat de ces modifications. Cette approche est spécialement bien adaptée à l'étude des virus, compte tenu de la relative simplicité et de la petite taille de leurs génomes; l'obstacle principal demeure de récupérer des virus infectieux à partir de génomes viraux clonés. Au cours des années, cet exploit a été accompli pour des représentants de presque toutes les familles de virus de mammifères. Jusqu'à récemment, les Reoviridae, virus à génome d'ARN bicaténaire segmenté, faisaient toutefois exception. Dans cette revue, les progrès réalisés vers la mise au point de la génétique inverse pour l'étude du réovirus seront discutés. La génétique inverse pourrait avoir un impact majeur dans l'optimisation de nouvelles souches de réovirus pour leur utilisation en thérapie comme agents oncolytiques et pour le développement de vaccins dans le cas des rotavirus et des orbivirus. Les travaux actuels font toutefois ressortir les limites de l'approche, la nécessité d'une analyse prudente des résultats obtenus, ainsi que le besoin de développer des systèmes plus efficaces et polyvalents.

ABSTRACT

In « classical » genetics, examination of a phenotype leads to the study of the gene(s) involved in its obtention. Reverse genetics is a powerful experimental approach in which, on the contrary, the genetic material is modified and used to reconstruct a complete organism, in order to study the result of these modifications. This approach is especially well adapted to the study of viruses, considering their relative simplicity and small size of their genomes; the main obstacle remains to recover infectious viruses from cloned viral genomes. Over the years, this exploit has been achieved with representatives of almost all families of mammalian viruses. Until recently, the Reoviridae, viruses with segmented double-stranded RNA genome, were an exception. In this review, the progress accomplished toward the development of such an approach for the reovirus will thus be discussed. Reverse genetics could have a major impact for the optimization of novel reovirus strains for their use in therapy as oncolytic viruses and for the development of vaccines in the case of rotaviruses and orbiviruses. However, current works stress the limitations of the approach, the need for careful analysis of the results obtained, as well as the necessity to develop more efficient and polyvalent systems.

Introduction à la génétique inverse

Par définition, la génétique inverse consiste à introduire des changements (mutations, délétions, insertions) au sein d'un génome dans le but d'examiner l'effet de ces changements « dirigés » chez l'organisme entier. Il s'agit donc d'étudier un phénotype à partir d'un génotype choisi, soit le contraire de la génétique dite classique, où l'on observe un phénotype avant de tenter d'en établir la cause au niveau du génotype.

En virologie, la génétique inverse nécessite de produire un nouveau virus, capable de se multiplier et de se propager, à partir du matériel génétique viral sous forme d'ADN cloné et soumis à diverses manipulations. On peut aussi aller plus loin en intégrant des séquences exogènes (gène rapporteur, thérapeutique, ou autre). Depuis l'avènement du génie génétique, l'utilisation de la génétique inverse a donc constitué un instrument de choix pour la compréhension des modes de réplication et du pouvoir pathogène des virus. Ce type de modification du génome viral a aussi servi dans la mise au point de vecteurs viraux pour le transfert de matériel génétique d'une cellule, ou d'un organisme, à l'autre. Cependant, jusqu'à tout récemment, l'étude des virus à génome d'ARN bicaténaire segmenté, de la famille des *Reoviridae*, n'était toujours pas possible par cette approche. Dans cette brève revue, les progrès récents, permettant de croire que cet obstacle est maintenant levé, seront discutés. Il reste toutefois bien des questions quant à la généralisation de cette technique et les embûches à prévoir seront aussi envisagées. Le réovirus de mammifères du genre *Orthoreovirus*, pour lequel les progrès semblent les plus significatifs et mieux établis, sera examiné à titre d'exemple; dans le reste du texte, le terme « réovirus » réfère spécifiquement au réovirus de mammifères du genre *Orthoreovirus*. Des protocoles similaires sont toutefois déjà en voie d'être établis pour d'autres genres de *Reoviridae*, entre autres les rotavirus [1, 2, 3] et le virus de la fièvre catarrhale ovine (« bluetongue virus ») [4].

La synthèse des acides nucléiques de réovirus

Pour bien comprendre pourquoi la mise au point d'un système de génétique inverse efficace s'est avérée complexe dans le cas du réovirus, il vaut la peine de s'attarder un peu sur le mode de transcription et de réplication du génome viral. Pour de plus amples détails, on peut consulter la revue détaillée de la dernière édition du « Field's Virology » [5]. La capside du réovirus, sans enveloppe lipidique, se compose de deux couches concentriques de protéines. La capside externe joue son rôle principal lors des étapes d'adsorption et d'entrée du virus, mais c'est la capside interne ou nucléoïde (core, en anglais) qui porte toute la machinerie nécessaire à la synthèse des ARN messagers viraux. Le génome viral se compose

de dix segments d'ARN bicaténaire. Bien que chaque segment soit transcrit en un seul type d'ARN messager, celui-ci peut être traduit en plus d'une protéine par l'utilisation de codons d'initiation dans différents cadres de lecture. Des clivages protéolytiques se produisent aussi afin de générer plus d'une protéine à partir du produit initial de traduction. Les protéines sont par la suite localisées au niveau de la capsid interne ou externe; d'autres protéines synthétisées dans la cellule infectée ne sont pas incorporées à la particule virale et sont dites non structurales. Le tableau I présente un résumé des dix segments (gènes) viraux et des protéines qui sont produites à partir de ceux-ci.

Les différentes étapes du cycle de multiplication viral sont résumées à la figure 1. Après l'adsorption et l'entrée de la particule virale, la capsid externe est éliminée par des protéases cellulaires. La capsid interne demeure intacte et se retrouve dans le cytoplasme, le génome viral ne sera donc jamais libre dans la cellule-hôte. La transcription de chacun des segments et l'addition de la structure coiffe à l'extrémité 5' de l'ARN messager se fait sous l'action combinée de plusieurs protéines virales (polymérase, hélicase, triphosphatase ARN, guanylyltransférase, méthyltransférase). Ces différentes enzymes portées par le nucléoïde s'activent après l'élimination des protéines de la capsid externe. Les ARN messagers seront exportés à l'extérieur du nucléoïde au fur et à mesure de leur synthèse, ce qui a donné lieu à d'étonnantes images lors de l'examen au microscope électronique (Figure 2) [6]. Des travaux plus récents ont permis de confirmer, à plus haute résolution, la sortie de molécules d'ARN par les tourelles du nucléoïde [7].

Ces différents ARN serviront à la fois d'ARN messagers pour la traduction en protéines virales et de premiers brins pour la synthèse de nouveaux génomes viraux. Le génome viral bicaténaire ne sera pas synthétisé directement dans le cytoplasme; un complexe protéique se forme plutôt et incorpore chacun des ARN monocaténaires de polarité positive dans une structure intermédiaire où les acides nucléiques sont protégés de la dégradation par d'éventuelles nucléases. La synthèse du brin négatif complémentaire à l'ARN messager, afin de répliquer le génome viral, a lieu au sein de cette structure. La nature du complexe initial, permettant la reconnaissance d'un exemplaire de chacun des segments d'ARN, demeure peu claire. La nature des signaux ou « étiquettes » moléculaires, présents sur les molécules d'ARN, commence à peine à être mieux comprise, justement en grande partie grâce à l'utilisation de la génétique inverse. Cet aspect sera discuté plus loin.

On observe au sein des cellules infectées l'apparition de larges inclusions virales pour former des « usines à virus ». Les structures impliquées dans la réplication du génome viral, ainsi que les virions matures à double capsid, seront assemblées au sein de ces inclusions.

L'utilisation de l'interférence ARN a permis de démontrer la nature essentielle des inclusions puisque l'inhibition d'un seul gène impliqué dans leur formation peut empêcher la synthèse du génome viral [8]. Par contre, des études effectuées chez le rotavirus, un autre Reoviridae ayant un cycle de multiplication très similaire, ont démontré que la synthèse du génome viral n'est pas inhibée par la présence d'ARN interférents dirigés contre les ARN viraux codant pour des protéines qui ne participent pas directement à la formation des inclusions. Les auteurs suggèrent que la synthèse d'une sous-population d'ARN de polarité positive, ARN destinés à former le premier brin des nouveaux génomes viraux, s'effectue majoritairement au sein des inclusions virales; celles-ci seraient en quelque sorte imperméables aux ARN interférents [9, 10]. D'autres explications pourraient être envisagées et des travaux additionnels semblent nécessaires pour mieux comprendre le rôle des inclusions virales. Il demeure que de permettre leur formation au bon moment durant le cycle de multiplication viral est sans doute essentiel à la production de virus par génétique inverse.

Premiers efforts

Les premiers efforts sérieux vers la mise au point d'un système de génétique inverse pour les réovirus datent des années 1990. Il a alors été démontré que l'ARN viral pouvait être infectieux lorsqu'il est introduit dans des cellules par transfection [11]. Les premiers travaux ont utilisé différents mélanges d'ARN préparés par transcription *in vitro* à partir de nucléotides, également obtenus *in vitro* par digestion protéolytique de virions purifiés. [12, 13]. On ne peut, à proprement parler, qualifier de génétique inverse ces premières expériences; nous ne nous y attarderons donc pas davantage. Ces travaux devaient toutefois mener à la mise au point d'un premier système pour la manipulation du génome viral à partir des gènes clonés.

Le système par transfection d'ARN

Chez tous les membres de la famille des Reoviridae, chaque segment génomique débute et se termine par de courtes séquences identiques ou très similaires pour un virus donné. Dans le cas du réovirus de mammifères, le brin positif de chacun des 10 ARN commence par GCUA et se finit par UCAUC. On pense que ces extrémités terminales sont essentielles au niveau de la transcription, de l'encapsidation, de la réplication ou même de la traduction des acides nucléiques viraux. La mise au point d'un système de génétique inverse demande donc de permettre la conservation de ces séquences.

L'initiation de la transcription afin de générer l'extrémité 5' correcte peut s'effectuer facilement par certaines polymérases ARN, par exemple la polymérase du phage T7, pouvant

amorcer la transcription à l'endroit voulu. L'obtention de l'extrémité 3' peut s'avérer plus difficile. Le problème peut être contourné par l'utilisation d'un ribozyme, tel que celui du virus de l'hépatite D. La transcription du gène s'effectue normalement et se termine au niveau d'une séquence de terminaison pour la polymérase. L'ARN synthétisé porte ainsi une séquence ribozyme immédiatement à la suite de l'ARN viral, entraînant un clivage autocatalytique de manière à générer le UCAUC attendu (schématisé à la figure 3).

L'équipe des Drs Roner et Joklik, réussit ainsi à produire, par transcription *in vitro*, un ARN chimérique composé de la séquence codant pour une protéine étrangère au virus (gène rapporteur CAT) flanquée de 198 nucléotides de l'extrémité 5' et 284 nucléotides de l'extrémité 3' du gène S2 de réovirus. L'approche retenue pour introduire ce gène S2-CAT-S2 au sein du génome et de la capside virale était toutefois très complexe [14] et est schématisée à la figure 4. Le nucléoïde viral était toujours utilisé pour la synthèse *in vitro* d'un mélange des 10 ARN messagers viraux. Ce mélange était ensuite traité à la ribonucléase H, après hybridation avec un oligodéoxynucléotide complémentaire et spécifique de l'ARN messenger correspondant à S2. L'activité ribonucléase H permettant de dégrader la portion ARN d'un hybride ARN-ADN afin de le remplacer par l'ARN produit à partir du plasmide. Suivait alors un protocole d'introduction de l'ARN dans les cellules, incluant l'ajout de protéines virales, suivi de l'infection par un virus que nous appellerons « auxiliaire », faute de connaître son rôle exact. Des clones viraux pouvaient par la suite être obtenus par la technique classique de formation de plages. L'utilisation d'un virus auxiliaire à multiplication beaucoup plus lente que le virus utilisé pour produire l'ARN facilitait l'identification des clones. Le criblage, processus assez long et ardu, demeurait toutefois nécessaire puisque seulement la moitié des clones viraux portaient le gène S2-CAT-S2. Évidemment, ce virus se propageait seulement dans des cellules exprimant la protéine virale manquante ($\sigma 2$), mais pouvait se répliquer d'une manière efficace dans ces conditions, tout en entraînant l'expression de CAT dans les cellules infectées.

L'équipe du Dr Roner a par la suite effectué une élégante série d'expériences démontrant que des régions de 100 à 200 nucléotides aux deux extrémités des ARN viraux sont nécessaires et suffisantes pour permettre l'encapsidation, la réplication et la transcription des gènes viraux [15-17]. Cette idée n'est pas complètement nouvelle puisqu'il avait déjà été démontré qu'un gène M1 tronqué, comprenant 132-135 nucléotides de l'extrémité 5' et 183-185 nucléotides de l'extrémité 3', pouvait être encapsidé et répliqué [18]. Aucun segment plus petit n'avait été détecté dans cette étude précédente, suggérant qu'il s'agissait d'une longueur minimale. De manière un peu surprenante, des données récentes indiquent qu'il est tout de

même possible d'insérer 18 nucléotides immédiatement avant le codon de terminaison sur S1, sans effet apparent sur la réplication virale [19]. La situation est donc plus complexe qu'il n'y paraît et la structure en plus de la longueur des séquences conservées, joue certainement un rôle primordial. Il est possible que la structure secondaire ou tertiaire de l'ARN dans cette région permette l'insertion de nucléotides additionnels sans trop perturber cette structure. Une analyse effectuée dans notre laboratoire à l'aide de logiciels permettant de prédire le repliement de longues séquences d'ARN suggère la présence de régions qui demeurent monocaténares aux deux extrémités de l'ARN pour chacun des dix gènes (données non publiées), trois exemples représentatifs sont présentés à la figure 5. De telles structures avaient déjà été prédites pour le gène S2 de réovirus [16] et pour quelques gènes de rotavirus [20, 21]. La présence de régions monocaténares aux extrémités 5' et 3' de l'ARN messenger, pourrait, par contre, jouer un rôle dans la traduction de l'ARN messenger plutôt qu'au niveau de la transcription, la réplication ou l'encapsidation des acides nucléiques.

Mise au point d'un système utilisant la transfection de plasmides :

Bien qu'ayant été utilisée avec succès par l'équipe du Dr Roner, l'approche par transfection d'ARN ne s'est pas vraiment imposée. Comme toutes les approches nécessitant la manipulation d'ARN, il s'agit d'une méthode exigeante sur le plan technique; le choix d'une séquence cible adéquate pour le traitement à la ribonucléase H peut s'avérer spécialement complexe. La nécessité d'utiliser un virus auxiliaire, pour des raisons qui demeurent peu claires, pose également le problème du criblage. La présence d'un virus de type sauvage compliquerait la tâche pour la récupération des réovirus mutants dont la réplication est fortement diminuée.

En 2007, le groupe du Dr Terence Dermody rapportait pour la première fois l'utilisation d'une méthode par transfection de 10 plasmides codant chacun pour un des 10 ARN de réovirus. Les plasmides utilisés sont construits sur le même principe que dans l'approche basée sur l'ARN soit l'utilisation du promoteur T7 et du ribozyme à l'extrémité 3'.

L'introduction simultanée des 10 plasmides, combinée à l'expression de la polymérase T7 à l'aide d'un vecteur basé sur une souche du virus de la vaccine peu cytopathique pour les cellules de mammifères [23] a permis à l'équipe du Dr Dermody de réaliser ce qui fut considéré comme un progrès majeur [24]. Il réussirent en effet à obtenir le virus par un protocole ne nécessitant que l'utilisation de plasmides portant les gènes viraux sans aucun virus auxiliaire ni manipulation directe de l'ARN (Figure 6).

Dans notre laboratoire, nous avons rapidement adopté la technique pour nos propres

projets (manuscrits en préparation) concernant: (i) l'activité mucinolytique associée à une des protéines de la capsid externe du virus [25] et (ii) la réplication préférentielle d'un virus mutant chez les cellules transformées par l'oncogène Ras [26]. Nous avons toutefois évité l'utilisation du virus de la vaccine par l'utilisation d'une lignée de cellules BHK exprimant la polymérase T7 de manière constitutive [27]. Plusieurs groupes ont apparemment suivi la même voie et, dans un article plus récent, l'équipe du Dr Dermody rapporte effectivement l'utilisation de cette lignée cellulaire en remplacement du virus de la vaccine [28]; l'efficacité d'obtention de virus semble similaire dans les deux cas. Dans cette étude, les 10 plasmides ont aussi été remplacés par un système dans lequel les 10 gènes sont regroupés sur seulement 4 plasmides, ce qui augmente d'environ dix fois l'efficacité de récupération de virus. Les auteurs soulignent que la diminution du nombre de plasmides permet d'améliorer l'efficacité de la génétique inverse pour différents virus, principalement des virus à génome segmenté. Le gain apparaît toutefois marginal dans le cas de réovirus et il ne semble pas que ce système doive remplacer le système à 10 plasmides, plus polyvalent et facilitant la purification des plasmides et leur manipulation.

Le groupe du Dr Dermody a aussi rapporté la construction d'un ensemble complet des 10 gènes d'un autre isolat viral de sérotype différent. La disponibilité de deux isolats viraux permettrait de comparer deux souches de virus et de confirmer ainsi une foule de résultats obtenus précédemment par la technique de « réassortiment » génique, technique par laquelle un ou plusieurs segments d'un virus sont introduits dans un autre virus par co-infection [5]. La technique de génétique inverse devrait faciliter l'obtention des virus portant un seul gène d'un des deux sérotypes sur un fond génétique uniforme provenant de l'autre sérotype, les auteurs ont d'ailleurs démontré la faisabilité de cette approche [22, 28, 29].

Obstacles et limites :

Malgré les progrès accomplis et les résultats encourageants, il faudra tout de même demeurer prudent dans l'utilisation et l'interprétation des données obtenues par génétique inverse. Dans le cas d'échange de segment, il ne pourra pas toujours être facilement exclu que des mutations additionnelles apparaissent afin de permettre la compatibilité du nouveau gène, avec les autres segments génomiques du virus formant le « squelette »; ce problème avait déjà été souligné lors de l'utilisation du système basé sur l'ARN [12, 30].

Un problème similaire se pose lors de l'introduction d'une mutation sur un des gènes viraux. Il est assez facile de vérifier la séquence du gène muté lui-même, mais il ne faudrait toutefois pas écarter la possibilité que d'autres mutations apparaissent ailleurs. Il ne faut pas

non plus négliger le fait que les séquences nucléotidiques présentes dans les plasmides du protocole de génétique inverse ne sont pas nécessairement identiques aux séquences retrouvées chez les souches de virus retrouvées dans différents laboratoires. À titre d'exemple, le gène S1 utilisé dans le protocole de génétique inverse code pour une protéine $\sigma 1$ portant un site de clivage protéolytique résultant de la présence d'une thréonine en position 249 [31]; cet acide aminé est remplacé par une isoleucine chez la très grande majorité des séquences disponibles dans les banques de données. Le séquençage à partir du virus utilisé dans notre laboratoire a d'ailleurs confirmé la présence d'une isoleucine à cette position. Il a aussi été décrit que le gène M1 (codant pour la protéine $\mu 2$) présente des différences lorsque l'on compare des souches de différents laboratoires, les différences pouvant même modifier la morphologie des inclusions virales d'une manière flagrante [32]. Ces différences entre virus de différents laboratoires s'expliquent sans doute par le fait que les virus ont été régulièrement isolés de nouveau à partir d'une plaque. Cette procédure permet d'éliminer des virus mutants ayant perdu leur capacité de se répliquer par eux-mêmes; par contre, rien n'exclut que l'on puisse ainsi sélectionner des mutants pouvant passer inaperçus dans les conditions utilisées pour la multiplication du virus. De plus, les passages successifs du virus pendant de longues périodes de temps sur une lignée cellulaire unique ont sans doute occasionné une certaine dérive génétique, le virus étant adapté à bien se multiplier *in vitro* sur cette lignée. Il faut insister ici sur le fait que la possibilité de reproduire le virus par transfection des 10 gènes clonés permettra dorénavant d'éliminer ce problème et d'éviter certaines contradictions dans les résultats obtenus d'un laboratoire à l'autre. La question demeure : est-ce que le virus produit à partir des 10 plasmides provenant du laboratoire du Dr Dermody devrait être considéré comme la souche de référence? À noter aussi que la séquence complète du virus breveté par la compagnie Oncolytics sous le nom de Reolysin® a été rapportée (WO2008/110004); cette séquence diffère significativement de la séquence du virus de génétique inverse, bien qu'il s'agisse à l'origine de la même souche virale.

Une approche qui pourrait être envisagée afin d'estimer le risque que des mutations secondaires soient apparues sur les virus produits par génétique inverse serait de déterminer systématiquement le taux de récupération de virus comparativement à un contrôle de virus de type sauvage. Il est aussi possible que l'expression précoce de protéines virales nécessaires à l'inhibition de certaines fonctions cellulaires, par exemple la mise en place de la réponse à l'interféron, puisse faciliter la récupération de certains virus. Alternativement, la formation des inclusions virales assez tôt dans l'infection pourrait aussi jouer un rôle facilitateur. Il est donc possible que l'expression de certaines protéines (établissement de lignées permanentes,

expression transitoire, ou infection par des vecteurs viraux) permette de récupérer plus efficacement certains virus atténués. Il a déjà été démontré qu'il est possible de compléter un réovirus portant une protéine $\mu 2$ thermosensible par établissement d'une lignée permanente exprimant la protéine $\mu 2$ sauvage [33]. Dans leur article décrivant le système de génétique inverse, les auteurs utilisent aussi une lignée permanente exprimant la protéine $\sigma 3$, permettant la propagation d'un virus dont la séquence codante du gène viral correspondant a été remplacée par la séquence d'un gène rapporteur [22]. La même approche expérimentale avait été utilisée dans des études antérieures utilisant la méthode de génétique inverse à base d'ARN; encore là, la séquence codante du gène correspondant à la protéine $\sigma 3$ avait été remplacée par un gène rapporteur (le gène CAT) [14]. Il pourrait toutefois être plus difficile d'exprimer certaines protéines virales ayant un effet toxique sur les cellules, par exemple la protéine $\mu 1$ qui possède un fort pouvoir d'induction d'apoptose [34]. Dans de tels cas, il sera sans doute nécessaire d'utiliser un système d'expression utilisant un promoteur devant être induit plutôt qu'un système où le promoteur est constitutivement actif. Alternativement, l'utilisation de mutants moins toxiques pourrait contourner le problème; toujours dans le cas de $\mu 1$ il a été démontré que certaines mutations éliminent la capacité de la protéine à induire l'apoptose, sans empêcher son assemblage au sein de la capside ou la capacité du virus à se répliquer [35]. L'établissement d'une lignée permanente à partir d'une telle forme mutée de $\mu 1$ permettrait donc la complémentarité fonctionnelle.

Il demeure qu'il pourrait être difficile de récupérer des virus mutants lorsque ceux-ci présentent un important défaut de réplication et la prudence s'impose lorsqu'on introduit des mutations qui limitent la réplication du virus. Dans notre laboratoire, l'introduction d'une mutation générant un virus thermosensible a quand même permis de récupérer le virus. Toutefois, des clones viraux obtenus par repiquage de différentes plages ont révélé dans la plupart des cas la présence d'une seconde substitution d'acide aminé sur une autre protéine. Cette seconde substitution permet sans doute la réversion extragénique de la première mutation (données non publiées). Ce phénomène de « pseudoréversion » était déjà bien connu chez réovirus [36], comme d'ailleurs chez beaucoup d'autres virus.

Une publication récente rapporte pour la première fois l'utilisation d'une technique à haut débit pour le séquençage du génome de virus à ARN bicaténaire [37]. Il est à souhaiter que cette nouvelle approche permette, dans un proche avenir, de procéder facilement et à faible coût à une détermination complète de la séquence nucléotidique de chaque virus obtenu par génétique inverse. D'ici là, notre expérience nous indique qu'en cas de faible efficacité de

récupération d'un mutant viral, on se doit de soupçonner un phénomène de réversion ou de pseudoréversion.

Développements futurs :

Malgré les limites inhérentes à toute approche expérimentale, la génétique inverse représente un progrès majeur pour l'étude du réovirus. Nous assisterons sans doute au cours des prochaines années à de nouveaux développements visant à en augmenter l'efficacité. D'autres polymérases telles que l'ARN polymérase I, l'ARN polymérase II, ou la polymérase du cytomégalovirus, ont été employées en génétique inverse et leur utilisation reste à être explorée pour réovirus. À titre d'exemple, il a été rapporté que l'utilisation des séquences de terminaison de l'ARN polymérase I pouvait être plus efficace que l'utilisation d'un ribozyme pour générer des séquences 3' authentiques [38]. Il faut aussi remarquer qu'il a été démontré voilà plus de 30 ans que le brin positif du génome bicaténaire de réovirus porte une structure coiffe [39, 40]. La structure coiffe étant absente des ARN produits dans le cytoplasme des cellules exprimant la polymérase T7 de manière constitutive, il semble bien que cette structure ne soit pas absolument nécessaire à l'encapsidation de l'ARN et à la synthèse du génome viral. Par contre, l'absence de structure coiffe au sein des particules virales initialement produites contribue peut-être à limiter l'efficacité finale de récupération des virus. Il n'existe pas pour l'instant, à notre connaissance, de manière simple de contourner ce problème.

Il ne fait quand même aucun doute que l'avènement de la génétique inverse représente un progrès majeur; de multiples résultats, provenant d'études biochimiques et génétiques antérieures, seront sans doute validés ou invalidés de cette manière au cours des prochaines années. Au sein de la famille des Reoviridae, tel que mentionné en introduction, le rotavirus et le virus de la fièvre catarrhale ovine (un orbivirus), entre autres, font aussi l'objet d'études par génétique inverse; cette approche pourrait faciliter le développement de meilleurs vaccins dans le cas de ces virus pathogènes. Toutefois, dans ces deux cas, il n'est toujours pas possible d'obtenir des virus uniquement par transfection de plasmides. On peut penser que la comparaison des résultats obtenus avec ces différents virus puisse aussi contribuer à l'amélioration des méthodes pour tous Reoviridae.

D'un point de vue pratique, l'utilisation de réovirus comme virus oncolytique pourrait sans doute être optimisée davantage grâce à la génétique inverse [41]. À titre d'exemple, l'ajout à la capside de peptides reconnaissant des protéines à la surface des cellules cancéreuses permettrait de mieux cibler l'infection vers celles-ci; une telle stratégie est

envisagée pour d'autres virus tels que l'adénovirus et le virus de la rougeole [42, 43]. Un premier essai avec la protéine $\sigma 3$ s'est toutefois révélé peu concluant, l'interaction avec la protéine $\mu 1$ pour former la capside externe étant apparemment fortement diminuée [44]. Par contre, l'addition de la même séquence à la protéine $\mu 1$ permettait de maintenir une interaction normale avec $\sigma 3$ lorsque les deux protéines étaient co-exprimées. Malgré tout, de multiples essais pour obtenir le virus correspondant par la procédure de génétique inverse ont été infructueux (données non publiées).

Il semble toutefois que l'addition de peptides à l'extrémité carboxyle de la protéine $\sigma 1$, la protéine d'attachement du virus, puisse générer un virus pouvant se répliquer. De plus, le peptide additionnel permet l'infection de cellules portant un récepteur « artificiel », soit un anticorps reconnaissant ce peptide [19]. Ces travaux, effectués peu avant la mise au point de la génétique inverse par transfection de plasmides, ont fait appel à une stratégie que l'on pourrait qualifier de recombinaison-sélection (Figure. 7). Un vecteur lentiviral permettant la transcription de l'ARN codant pour la protéine $\sigma 1$ portant un épitope hexahistidine (6His) a été introduit dans des cellules qui ont ensuite été infectées avec réovirus. Par la suite, seuls les virus ayant intégré le gène modifié au sein de leur génome pouvaient se propager sur des cellules ne portant pas le récepteur pour réovirus, mais exprimant à leur surface un anticorps dirigé contre l'épitope 6His. Le mécanisme de « recombinaison », permettant d'obtenir la séquence codant pour la protéine $\sigma 1$ modifiée flanquée des séquences virales 5' et 3' authentiques, demeure toutefois peu clair. La stratégie apparaît complexe et ne sera sans doute plus guère utilisée à l'avenir; nous avons d'ailleurs récemment démontré que le même épitope pouvait être ajouté à $\sigma 1$ de manière beaucoup plus directe en utilisant l'approche par transfection de 10 plasmides (article en préparation).

L'addition de matériel génétique supplémentaire au sein du génome viral pourrait être plus simple si cette addition se faisait à l'extérieur des séquences codantes, sans ajout d'acides aminés aux protéines virales. Ceci permettrait, par exemple, l'addition de séquences complémentaires à des micro-ARN spécifiques, pour modifier, ou moduler le tropisme viral. Cette approche semble prometteuse pour plusieurs virus oncolytiques, tels que le virus de la stomatite vésiculaire ou le virus herpès, afin de les rendre plus sûrs et mieux ciblés aux cellules cancéreuses [45-47].

En conclusion, malgré les limites inhérentes à toute stratégie expérimentale, l'élaboration de différents protocoles permettant de modifier le génome de réovirus ouvre une nouvelle ère dans l'étude de ces virus fascinants qui sont loin de nous avoir livré tous leurs secrets.

Remerciements

Les travaux poursuivis dans le laboratoire de l'auteur sont actuellement subventionnés par le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG). L'auteur tient aussi à remercier Virginie Brochu-Lafontaine, Roland Jabre et Véronique Sandekian pour de nombreux échanges d'idées dans le cadre de leurs travaux de recherche au laboratoire; sincères remerciements également au Dr Richard A. Bellamy (University of Auckland, Nouvelle-Zélande) pour l'autorisation d'utiliser la photographie de microscopie électronique présentée à la figure 2.

Références

1. Komoto, S., Sasaki, J., Taniguchi, K. Reverse genetics system for introduction of site-specific mutations into the double-stranded RNA genome of infectious rotavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103 : 4646-51.
2. Troupin, C., Dehee, A., Schnuriger, A., Vende, P., Poncet, D., Garbarg-Chenon, A. Rearranged genomic RNA segments offer a new approach to the reverse genetics of rotaviruses. *J Virol* 2010; 84 : 6711-9.
3. Trask, S.D., Taraporewala, Z.F., Boehme, K.W., Dermody, T.S., Patton, J.T. Dual selection mechanisms drive efficient single-gene reverse genetics for rotavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107 : 18652-7.
4. Boyce, M., Celma, C.C., Roy, P. Development of reverse genetics systems for bluetongue virus: recovery of infectious virus from synthetic RNA transcripts. *J Virol* 2008; 82 : 8339-48.
5. Schiff, L.A., Nibert, M.L., Tyler, K.L. Orthoreoviruses and their replication, In : Knipe, D.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Straus, S.E., Howley, P.M. (Eds.) *Fields Virology* . Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007 : 1853-915.
6. Bartlett, N.M., Gillies, S.C., Bullivant, S., Bellamy, A.R. Electron microscopy study of reovirus reaction cores. *J Virol* 1974; 14 : 315-26.
7. Mendez, II, Weiner, S.G., She, Y.M., Yeager, M., Coombs, K.M. Conformational changes accompany activation of reovirus RNA-dependent RNA transcription.

J Struct Biol 2008; 162 : 277-89.

8. Kobayashi, T., Chappell, J.D., Danthi, P., Dermody, T.S. Gene-specific inhibition of reovirus replication by RNA interference. *J Virol* 2006; 80 : 9053-63.
9. Arias, C.F., Dector, M.A., Segovia, L., Lopez, T., Camacho, M., Isa, P., Espinosa, R., Lopez, S. RNA silencing of rotavirus gene expression. *Virus Res* 2004; 102 : 43-51.
10. Silvestri, L.S., Taraporewala, Z.F., Patton, J.T. Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasms. *J Virol* 2004; 78 : 7763-74.
11. Roner, M.R., Sutphin, L.A., Joklik, W.K. Reovirus RNA is infectious. *Virology* 1990; 179 : 845-52.
12. Roner, M.R., Lin, P.N., Nepluev, I., Kong, L.J., Joklik, W.K. Identification of signals required for the insertion of heterologous genome segments into the reovirus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92 : 12362-6.
13. Roner, M.R., Nepliouev, I., Sherry, B., Joklik, W.K. Construction and characterization of a reovirus double temperature-sensitive mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94 : 6826-30.
14. Roner, M.R., Joklik, W.K. Reovirus reverse genetics: Incorporation of the CAT gene into the reovirus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98 : 8036-41.
15. Roner, M.R., Steele, B.G. Localizing the reovirus packaging signals using an engineered m1 and s2 ssRNA. *Virology* 2007; 358 : 89-97.
16. Roner, M.R., Bassett, K., Roehr, J. Identification of the 5' sequences required for incorporation of an engineered ssRNA into the Reovirus genome. *Virology* 2004; 329 : 348-60.
17. Roner, M.R., Roehr, J. The 3' sequences required for incorporation of an engineered ssRNA into the Reovirus genome. *Virol J* 2006; 3 : 1.
18. Zou, S., Brown, E.G. Identification of sequence elements containing signals for replication and encapsidation of the reovirus M1 genome segment. *Virology* 1992; 186 : 377-88.
19. van den Wollenberg, D.J., van den Hengel, S.K., Dautzenberg, I.J., Cramer, S.J., Kranenburg, O., Hoeben, R.C. A strategy for genetic modification of the spike-encoding segment of human reovirus T3D for reovirus targeting. *Gene Ther* 2008; 15 : 1567-78.
20. Patton, J.T., Spencer, E. Genome replication and packaging of segmented double-

- stranded RNA viruses. *Virology* 2000; 277 : 217-25.
21. Tortorici, M.A., Shapiro, B.A., Patton, J.T. A base-specific recognition signal in the 5' consensus sequence of rotavirus plus-strand RNAs promotes replication of the double-stranded RNA genome segments. *RNA* 2006; 12 : 133-46.
 22. Kobayashi, T., Antar, A.A., Boehme, K.W., Danthi, P., Eby, E.A., Guglielmi, K.M., Holm, G.H., Johnson, E.M., Maginnis, M.S., Naik, S., Skelton, W.B., Wetzel, J.D., Wilson, G.J., Chappell, J.D., Dermody, T.S. A plasmid-based reverse genetics system for animal double-stranded RNA viruses. *Cell Host Microbe* 2007; 1 : 147-57.
 23. Ishii, K., Ueda, Y., Matsuo, K., Matsuura, Y., Kitamura, T., Kato, K., Izumi, Y., Someya, K., Ohsu, T., Honda, M., Miyamura, T. Structural analysis of vaccinia virus DIs strain: application as a new replication-deficient viral vector. *Virology* 2002; 302 : 433-44.
 24. Baric, R.S., Sims, A.C. A Reverse genetics system for dsRNA viruses. *Cell Host Microbe* 2007; 1 : 90-1.
 25. Bisailon, M., Senechal, S., Bernier, L., Lemay, G. A glycosyl hydrolase activity of mammalian reovirus sigma1 protein can contribute to viral infection through a mucus layer. *J Mol Biol* 1999; 286 : 759-73.
 26. Rudd, P., Lemay, G. Correlation between interferon sensitivity of reovirus isolates and ability to discriminate between normal and Ras-transformed cells. *J Gen Virol* 2005; 86 : 1489-97.
 27. Buchholz, U.J., Finke, S., Conzelmann, K.K. Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. *J Virol* 1999; 73 : 251-9.
 28. Kobayashi, T., Ooms, L.S., Ikizler, M., Chappell, J.D., Dermody, T.S. An improved reverse genetics system for mammalian orthoreoviruses. *Virology* 2010; 398 : 194-200.
 29. Zurney, J., Kobayashi, T., Holm, G.H., Dermody, T.S., Sherry, B. Reovirus mu2 protein inhibits interferon signaling through a novel mechanism involving nuclear accumulation of interferon regulatory factor 9. *J Virol* 2009; 83 : 2178-87.
 30. Joklik, W.K., Roner, M.R. What reassorts when reovirus genome segments reassort? *J Biol Chem* 1995; 270 : 4181-4.

31. Chappell, J.D., Barton, E.S., Smith, T.H., Baer, G.S., Duong, D.T., Nibert, M.L., Dermody, T.S. Cleavage susceptibility of reovirus attachment protein sigma1 during proteolytic disassembly of virions is determined by a sequence polymorphism in the sigma1 neck. *J Virol* 1998; 72 : 8205-13.
32. Yin, P., Keirstead, N.D., Broering, T.J., Arnold, M.M., Parker, J.S., Nibert, M.L., Coombs, K.M. Comparisons of the M1 genome segments and encoded mu2 proteins of different reovirus isolates. *Virol J* 2004; 1 : 6.
33. Zou, S., Brown, E.G. Stable expression of the reovirus mu2 protein in mouse L cells complements the growth of a reovirus ts mutant with a defect in its M1 gene. *Virology* 1996; 217 : 42-8.
34. Coffey, C.M., Sheh, A., Kim, I.S., Chandran, K., Nibert, M.L., Parker, J.S. Reovirus outer capsid protein micro1 induces apoptosis and associates with lipid droplets, endoplasmic reticulum, and mitochondria. *J Virol* 2006; 80 : 8422-38.
35. Danthi, P., Coffey, C.M., Parker, J.S., Abel, T.W., Dermody, T.S. Independent regulation of reovirus membrane penetration and apoptosis by the mu1 phi domain. *PLoS Pathog* 2008; 4 : e1000248.
36. Ramig, R.F. Suppression and reversion of mutant phenotype in reovirus. *Curr Top Microbiol Immunol* 1998; 233 : 109-35.
37. Potgieter, A.C., Page, N.A., Liebenberg, J., Wright, I.M., Landt, O., van Dijk, A.A. Improved strategies for sequence-independent amplification and sequencing of viral double-stranded RNA genomes. *J Gen Virol* 2009; 90 : 1423-32.
38. Feng, L., Li, F., Zheng, X., Pan, W., Zhou, K., Liu, Y., He, H., Chen, L. The mouse Pol I terminator is more efficient than the hepatitis delta virus ribozyme in generating influenza-virus-like RNAs with precise 3' ends in a plasmid-only-based virus rescue system. *Arch Virol* 2009; 154 : 1151-6.
39. Furuichi, Y., Muthukrishnan, S., Shatkin, A.J. 5'-Terminal m-7G(5')ppp(5')G-m-p in vivo: identification in reovirus genome RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; 72 : 742-5.
40. Miura, K., Watanabe, K., Sugiura, M., Shatkin, A.J. The 5'-terminal nucleotide sequences of the double-stranded RNA of human reovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974; 71 : 3979-83.
41. Van Den Wollenberg, D.J., Van Den Hengel, S.K., Dautzenberg, I.J., Kranenburg, O., Hoeben, R.C. Modification of mammalian reoviruses for use as oncolytic agents. *Expert Opin Biol Ther* 2009; 9 : 1509-20.

42. Blehacz, B., Russell, S.J. Measles virus as an oncolytic vector platform. *Curr Gene Ther* 2008; 8 : 162-75.
43. Mathis, J.M., Stoff-Khalili, M.A., Curiel, D.T. Oncolytic adenoviruses - selective retargeting to tumor cells. *Oncogene* 2005; 24 : 7775-91.
44. Rouault, E., Lemay, G. Incorporation of epitope-tagged viral sigma3 proteins to reovirus virions. *Can J Microbiol* 2003; 49 : 407-17.
45. Bell, J.C., Kim, D. MicroRNAs fine-tune oncolytic viruses. *Nat Biotechnol* 2008; 26 : 1346-8.
46. Kelly, E.J., Hadac, E.M., Greiner, S., Russell, S.J. Engineering microRNA responsiveness to decrease virus pathogenicity. *Nat Med* 2008; 14 : 1278-83.
47. Kelly, E.J., Nace, R., Barber, G.N., Russell, S.J. Attenuation of vesicular stomatitis virus encephalitis through microRNA targeting. *J Virol* 2010; 84 : 1550-62.
48. Hofacker, I.L. Vienna RNA secondary structure server. *Nucleic Acids Res* 2003; 31 : 3429-31.

Légendes des figures :

Figure 1 : Représentation schématique des différentes étapes de synthèse des acides nucléiques viraux lors du cycle de réplication du réovirus.

Figure 2 : Photographie en microscopie électronique démontrant la synthèse d'ARN messager lors d'une transcription *in vitro* effectuée à partir de capsides internes (nucléoïdes) de réovirus [6] (figure tirée de l'article avec permission de l'auteur et de l'éditeur). Le trait noir est d'une longueur de 200 nanomètres.

Figure 3 : Représentation schématique du vecteur utilisé pour la production d'ARN de réovirus utilisant le promoteur T7 et le ribozyme du virus de l'hépatite delta.

Figure 4 : Représentation schématique des différentes étapes menant à la production de virus par génétique inverse utilisant l'approche par transfection d'ARN.

Figure 5 : Représentation de structures terminales potentiellement importantes pour la transcription, la réplication ou l'encapsidation du matériel génétique viral. La structure secondaire découlant du repliement de la séquence complète de l'ARN monocaténaire correspondant aux segments S4 et L2 a été obtenue en utilisant RNAfold [48] (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>). La structure comprenant les extrémités conservées en 5' (GCUA) et 3' (UCAUC) est présentée.

Figure 6 : Représentation schématique des différentes étapes menant à la production de virus par génétique inverse utilisant l'approche par transfection de plasmides.

Figure 7 : Représentation schématique de l'approche de génétique inverse utilisant l'approche de recombinaison-sélection.

Tableau I:**Les 10 segments génomiques du réovirus et les protéines correspondantes**

Gène (paires de bases)	Protéine(s)	Localisation	Rôle ou activité
L1 (3860)	$\lambda 3$	Capside interne (nucléoïde)	Synthèse d'ARN messenger (ARN polymérase)
L2 (3916)	$\lambda 2$	Tourelle transcapside	Synthèse de la coiffe de l'ARN messenger (guanylyltransférase méthyltransférase)
L3 (3910)	$\lambda 1$	Capside interne (nucléoïde)	Transcription et synthèse de la coiffe? (hélicase? ARN triphosphatase?)
M1 (2304)	$\mu 2$	Capside interne (nucléoïde)	Transcription et synthèse de la coiffe? Formation des inclusions
M2 (2203)	$\mu 1$ $\mu 1C$ $\mu 1N$ δ θ	Capside externe Capside externe Capside externe Capside externe Capside externe	Structural, proapoptotique Pénétration transmembranaire
M3 (2241)	μNS μNSC	Non-structurale (inclusions) Non structurale	Formation des inclusions. Encapsidation du génome?
S1 (1416)	$\sigma 1$ $\sigma 1S$	Capside externe (spicule) Non structurale ($\sigma 1NS$)	Attachement à la cellule Apoptose? Apoptose et pathogenèse?
S2 (1331)	$\sigma 2$	Capside interne (nucléoïde)	Structural
S3 (1198)	σNS	Non structurale (inclusions)	Formation des inclusions? Encapsidation du génome?
S4 (1196)	$\sigma 3$	Capside externe	Structural Résistance à l'interféron

Figure 1

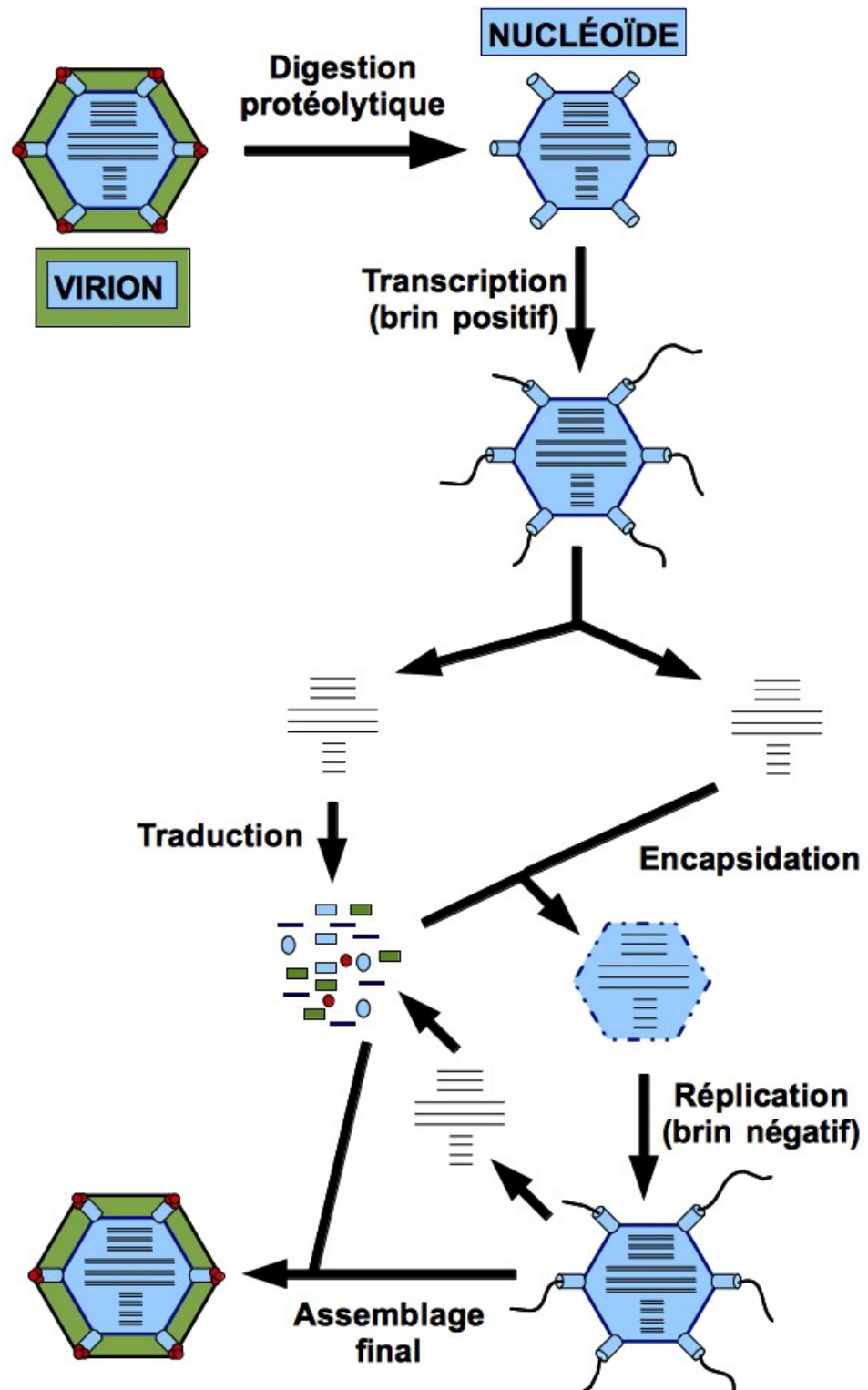


Figure 2

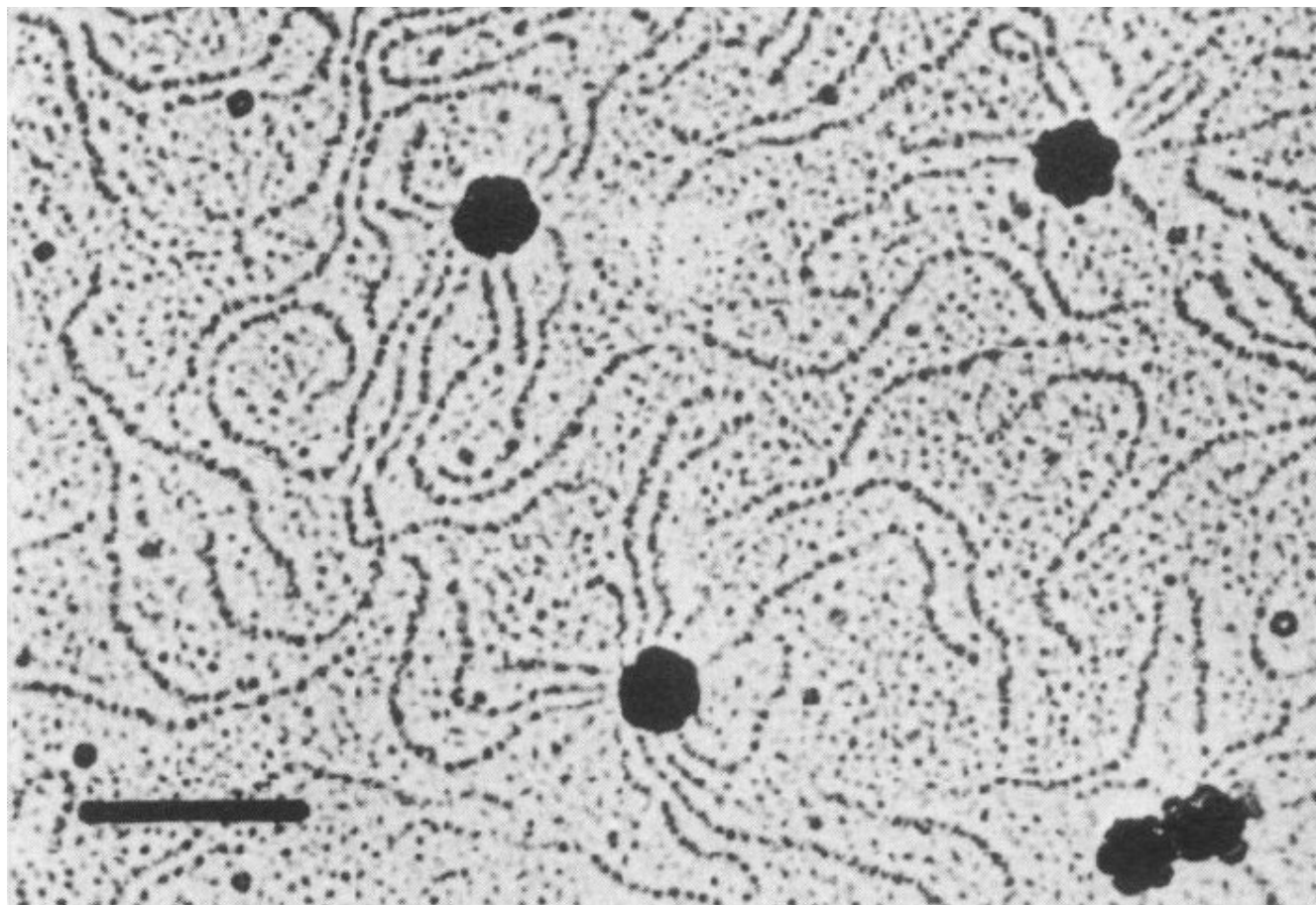


Figure 3

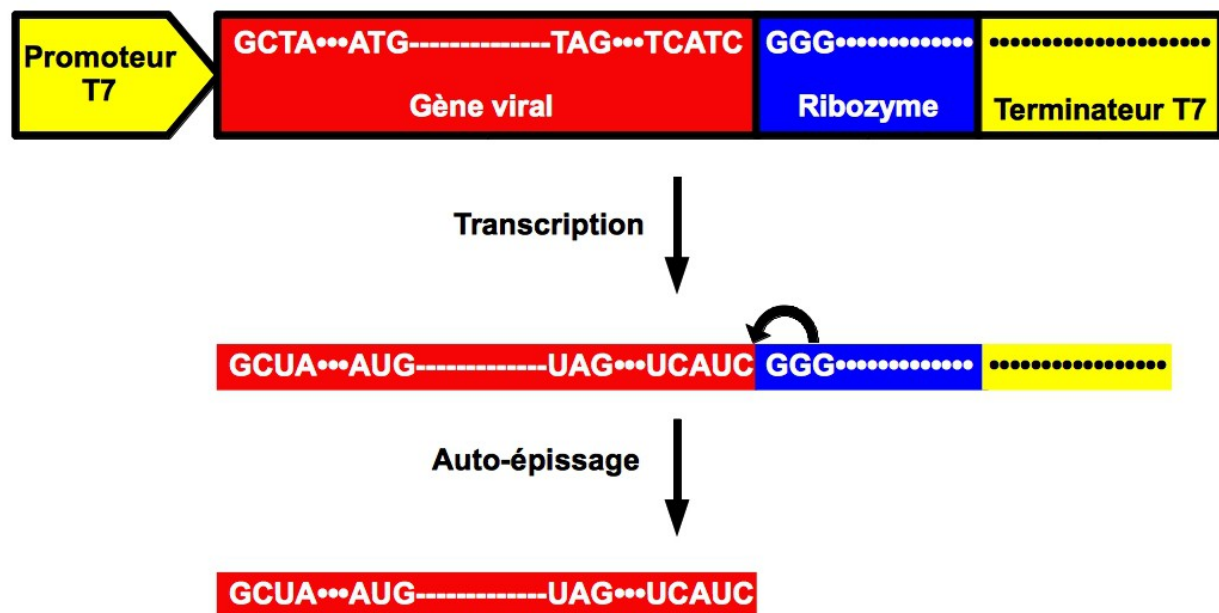


Figure 4

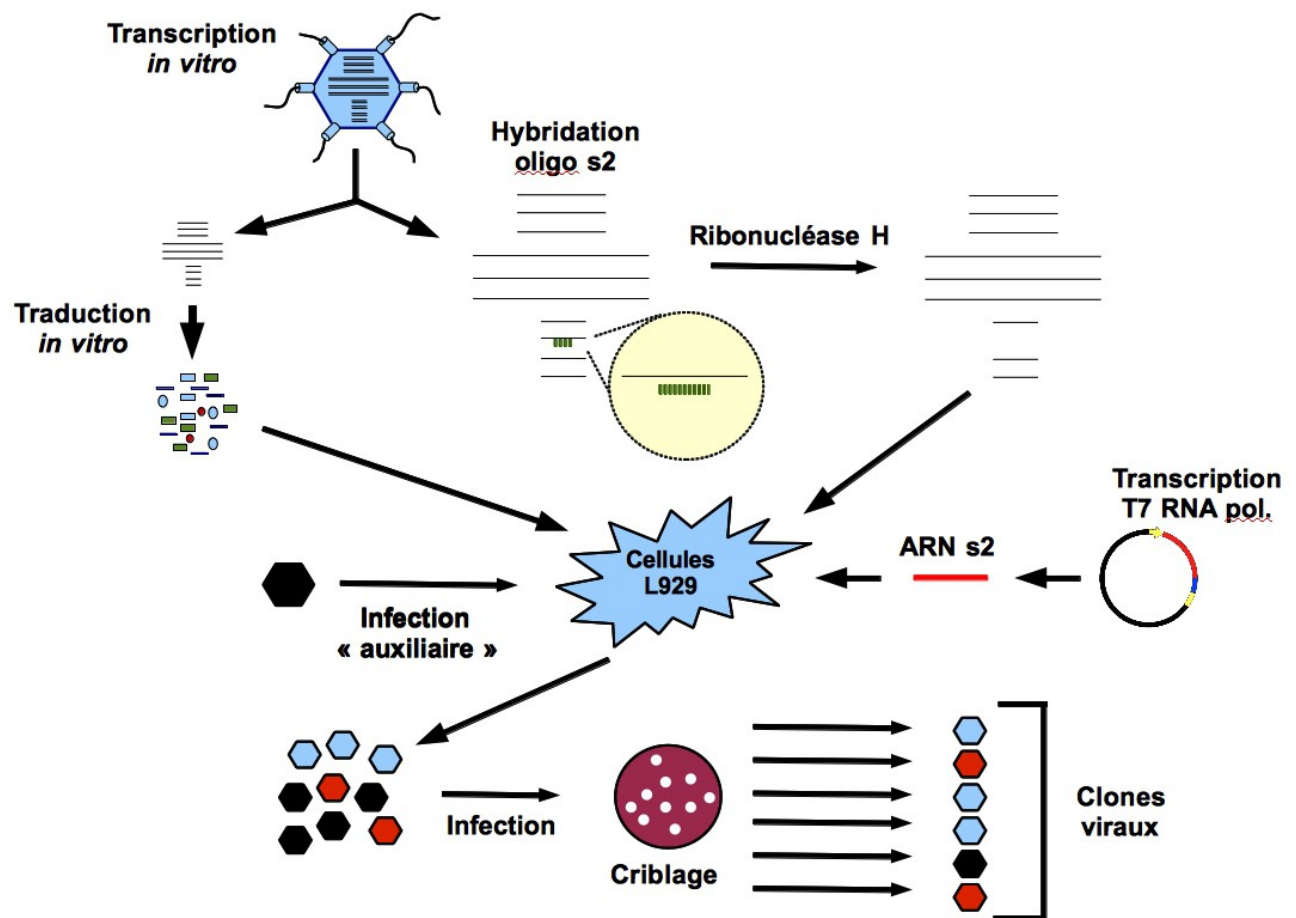
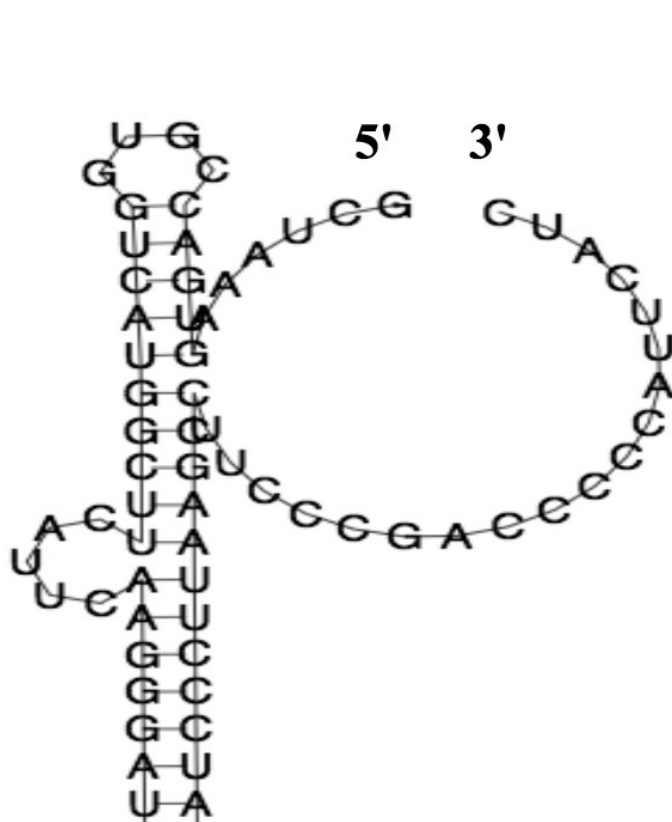


Figure 5



M3



S4

Figure 6

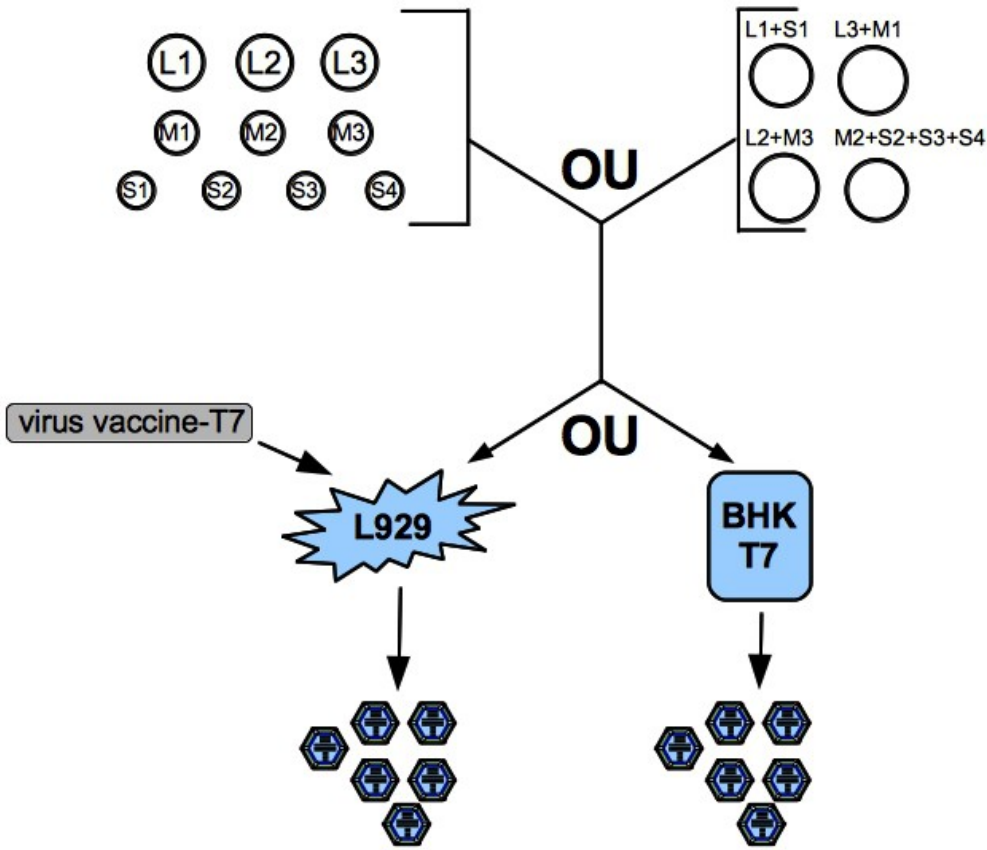


Figure 7

